

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

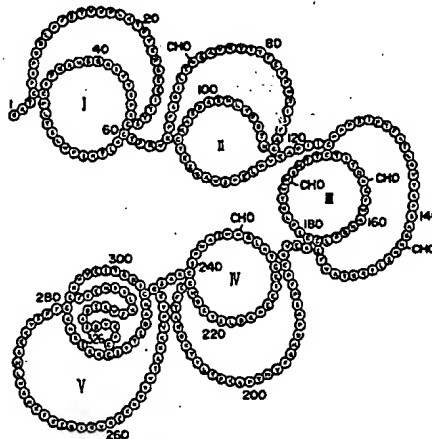


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|---|----------------------------|
| (51) 国際特許分類 G01N 33/564, 33/53 | A1 | (11) 国際公開番号 WO 95/14231 |
| (43) 国際公開日 1995年5月26日 (95.05.26) | | |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01929</p> <p>(22) 国際出願日 1994年11月15日(15. 11. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/309874 1993年11月16日(16. 11. 93) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) ヤマサ醤油株式会社(YAMASA CORPORATION)(JP/JP) 〒288 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 松浦栄次(MATSUURA, Eiji)(JP/JP) 〒288 千葉県銚子市上野町285番地の24 Chiba, (JP) 永江尚人(NAGAE, Hisato)(JP/JP) 〒288 千葉県銚子市落川町4-651 Chiba, (JP) 五十嵐 誠(IGARASHI, Makoto)(JP/JP) 五十嵐佳子(IGARASHI, Yoshiko)(JP/JP) 〒288 千葉県銚子市新生町2丁目15番地の23 Chiba, (JP) 小池隆夫(KOIKE, Takao)(JP/JP) 〒060 北海道札幌市中央区北二条西18丁目1-2 Hokkaido, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p> | <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> | |

(54) Title : METHOD OF ASSAYING ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODY AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称 抗リン脂質抗体の測定法及びキット



(57) Abstract

A method of assaying an antiphospholipid antibody contained in a sample by using β 2-glycoprotein I, wherein use is made of, instead of the same, a polypeptide having the same amino acid sequence as that of the domain IV of β 2-glycoprotein I or a polypeptide which is partially different from the above polypeptide but is equivalent thereto in function, thereby permitting an easy and accurate assay of an autoantibody originating in antiphospholipid antibody syndrome.

(57) 要約

β 2-グリコプロテイン I を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロテイン I の代わりに、 β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することにより、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の簡便でかつ正確な測定が可能となる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-----------|----|-------------|----|----------|----|------------|
| AM | アルメニア | EE | エストニア | LK | スリランカ | RU | ロシア連邦 |
| AT | オーストリア | ES | スペイン | LR | リベリア | SE | スウェーデン |
| BB | バルバドス | FR | フランス | LT | リトアニア | SG | シンガポール |
| BG | ブルガリア | GA | ガボン | LU | ルクセンブルグ | SI | スロベニア |
| BF | ブルキナ・ファソ | GB | イギリス | LV | ラトヴィア | SK | スロバキア共和国 |
| BG | ブルガリア | GE | グルジア | MC | モナコ | SN | セネガル |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MD | モルドバ | SZ | スワジランド |
| BR | ブラジル | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TD | チャド |
| BY | ベラルーシ | GU | グアム | ML | マリ | TG | トーゴ |
| CA | カナダ | IE | アイルランド | MN | モンゴル | TJ | タジキスタン |
| CC | 中央アフリカ共和国 | IS | アイスランド | MR | モリタニア | TM | トルクメニスタン |
| CG | コンゴ | IT | イタリア | MW | マラウイ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CH | スイス | JP | 日本 | MX | メキシコ | UA | ウクライナ |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア | NE | ニジェール | UG | ウガンダ |
| CM | カメルーン | KG | キルギスタン | NL | オランダ | US | 米国 |
| CN | 中国 | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NO | ノルウェー | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| CZ | チェコ共和国 | KR | 韓国 | NZ | ニュージーランド | VN | ベトナム |
| DE | ドイツ | KZ | カザフスタン | PL | ポーランド | | |
| DK | デンマーク | LI | リヒテンシュタイン | PT | ポルトガル | | |
| | | | | RO | ルーマニア | | |

明 細 書

抗リン脂質抗体の測定法及びキット

5 技術分野

本発明は、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法を実施するためのキットに関し、より詳細には β 2-グリコプロテイン I を使用する代わりに、 β 2-グリコプロテイン I の特定のドメインと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴としたものである。

背景技術

抗リン脂質抗体の一種である抗カルジオリピン抗体の測定法としては、HarrisらによるRIA法 (Lancet, iii: 1211, 1983)、小池らのELISA法 (Clin. Exp. Immunol., 56:193, 1984) などの方法が報告されている。

しかし、上述の方法は、抗カルジオリピン抗体を正確に定量できなかつたり、感染症由来の抗体と抗リン脂質抗体症候群由来の抗体とを区別して測定できないといった問題を有し、必ずしも満足できるものではなかった。

松浦らは、抗リン脂質抗体症候群由来の抗カルジオリピン抗体は固相化したカルジオリピンを認識するのではなく、カルジオリピンと β 2-グリコプロテイン I (β 2-GPI) (別名: アポリポプロテイン H または抗カルジオリピンコファクター) との複合体を認識することを見

い出すとともに、この原理を利用して、上述の従来法の

問題点を克服しうる抗リン脂質抗体の測定法を開発した
(Lancet, 336:177, 1990、臨床免疫, 22(Suppl. 15):170,
1990、W091/06006、J. Immunol., 148: 3855, 1992)。

- 5 さらに、松浦らのその後の研究により、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体（従来、抗カルジオリピン抗体と呼ばれていたもの）は、カルジオリピンそのものに反応するのではなく、カルジオリピン固相化プレートのよ
うな、酸素原子が存在する疎水表面と相互作用すること
10 により構造変化した $\beta 2$ -G P Iを認識する抗体であることを明らかにし（J. Exp. Med., 179, 457-462, (1994)、感染・炎症・免疫, 23, 9(1993))、この原理を応用して、従来のようにカルジオリピンなどのリン脂質を使用することなく、極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -G P Iだ
15 けを結合させた固相試薬を用いて抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体を測定する方法も開発した（W093/16387）。

- 一方、 $\beta 2$ -G P Iは公知の糖タンパク質であり、そのアミノ酸配列及び塩基配列も既に明らかにされているが
20 (Int. Immunol., 3, 1217-1221(1991)、Biochem. J., 277, 387(1991)、Gene, 108, 293(1991))、(1)その分子内にシステイン-システイン結合(S-S結合)が11個存在し、五つのドメインから構成される”スドメイン”と呼ばれる特徴ある1次構造を持っていること
25 (第1図参照)、(2) $\beta 2$ -G P Iは成熟蛋白のN末端

側に 19 個のアミノ酸から成るペプチドが付随した前駆

- 体蛋白としてコードされており、発現された前駆体蛋白の余分なペプチドは分泌時に切断されること、などの理由から通常の大腸菌や酵母による発現系ではプロセッシング、システイン同士の結合などの発現後の蛋白の修飾が正確に行われず、活性を有する $\beta 2$ -G P I を発現させることは困難であると考えられていた。

- しかしながら、最近、五十嵐らは、バキュロウイルス発現系を用いることにより上記問題を克服できることを見だし、バキュロウイルス発現系を用いて製造された組換え $\beta 2$ -G P I が、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定に利用できることを報告している (Clin. Exp. Immunol., 93, 19 (1993)、特願平 4 - 1 5 2 6 1 9 号)。

- 15 上述したように、 $\beta 2$ -G P I が抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定に必要不可欠なタンパク質であることが疑いようのない事実であることは明らかにされたものの、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の臨床的意義については依然として未だに不明な点が多い。したがって、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の $\beta 2$ -G P I との反応性を明らかにすることは、抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムの解明、及びより簡便な測定系の確立などにもつながりうることであり、今後の重要課題と考えられている。

- 25 発明の開示

本発明者らは、五つのドメインから構成される $\beta 2$ -

G P I の各ドメインの抗リン脂質抗体症候群由来の自己
抗体の測定上の機能を解明すべく、特定のドメインを欠
落させた変異タンパク質（該変異タンパク質を「欠失変
5 異タンパク質（deleted mutant protein）」または「ド
メイン欠失変異タンパク質（domain deleted mutant
protein）」という）を作製し、ドメイン欠失変異タン
パク質と抗体との反応性を解析した結果、①第1図に示
される $\beta 2$ -G P I の第5ドメイン（ドメインV）にリン
10 脂質との結合部位が存在すること、②抗リン脂質抗体症
候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部
位）は第4ドメイン（ドメインIV）を中心とする構造
であること、③このエピトープは通常隠れているが、ド
メインVがリン脂質など結合することにより、構造変化
15 を起こして抗体が認識できるようになることなどを見い
だした。

本発明者らは、これらの知見を抗リン脂質抗体症候群
由来の自己抗体の測定への応用に関してさらに研究を重
ね、本発明を完成させた。

20 従って、本発明は、 $\beta 2$ -G P I を利用してサンプル中
の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P I
の代わりに、 $\beta 2$ -G P I 中のドメインIVと同一のアミ
ノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に
相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する
25 ことを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法

に使用するキットに関するものである。

また、本発明は、担体にリン脂質を結合させた固相試薬と $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインI VとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

10 さらに、本発明は、担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインI Vと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

さらにまた、本発明は、極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインI VとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体

20

25

の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。
る。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒト血清由来 $\beta 2$ -G P I (I - V) の一次
5 構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第2図は、ドメイン欠失変異蛋白 (I - I V) の一次
構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第3図は、ドメイン欠失変異蛋白 (I - I I I) の一
次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

10 第4図は、ドメイン欠失変異蛋白 (I I - V) の一次
構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第5図は、ドメイン欠失変異蛋白 (I I I - V) の一
次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第6図は、ドメイン欠失変異蛋白 (I V - V) の一次
15 構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第7図は、本発明方法で得られた各ドメイン欠失変異
蛋白の精製標品のS D S - ポリアクリルアミドゲル電気
泳動 (クマシーブルー染色) による分析の結果を示した
ものである。

20 第8図は、本発明方法で得られた各ドメイン欠失変異
蛋白とマウス抗ヒト $\beta 2$ -G P I モノクロナール抗体の反
応性をE L I S A法にて比較したものである。

第9図は、第8図に示した結果より判明したマウス抗
ヒト $\beta 2$ -G P I モノクロナール抗体に対する $\beta 2$ -G P I
25 の抗原決定基を解析したものである。

第 1 0 図は、各ドメイン欠失変異蛋白とS-プレート

を用いたELISA法により、抗カルジオリピン抗体
(抗CL抗体)の抗原決定基を検討したのものである。

第 1 1 図は、各ドメイン欠失変異蛋白とC-プレート
5 を用いたELISA法により、抗CL抗体の抗原決定基
を検討したのものである。

第 1 2 図は、各ドメイン欠失蛋白とS-プレートを用
いたELISA法により、健常人血清中の抗CL抗体の
抗原決定基を検討したのものである。

10 第 1 3 図は、各ドメイン欠失蛋白とS-プレートを用
いたELISA法により、SLE患者血清中の抗CL抗
体の抗原決定基を検討したのものである。

第 1 4 図は、各ドメイン欠失蛋白とS-プレートを用
いたELISA法により、梅毒患者血清中の抗CL抗体
15 の抗原決定基を検討したのものである。

第 1 5 図は、各ドメイン欠失蛋白とC-プレートを用
いたELISA法により、健常人血清中の抗CL抗体の
抗原決定基を検討したのものである。

第 1 6 図は、各ドメイン欠失蛋白とC-プレートを用
20 いたELISA法により、SLE患者血清中の抗CL抗
体の抗原決定基を検討したのものである。

第 1 7 図は、各ドメイン欠失蛋白とC-プレートを用
いたELISA法により、梅毒患者血清中の抗CL抗体
の抗原決定基を検討したのものである。

25 第 1 8 図は、各ドメイン欠失蛋白ならびにカルジオリ

ピン固相プレートを用いたE L I S A法により、 $\beta 2$ -

G P Iの抗カルジオリピン抗体の抗原決定基を検討したものである。

第19図は、各ドメイン欠失変異蛋白、カルジオリピン固相プレートおよび抗 $\beta 2$ -G P I抗体を用いたE L I S A法により、 $\beta 2$ -G P Iのカルジオリピンに対する結合部位の検討結果を示したものである。なお、第10～19図におけるB Lはブランクを示す。

第20図は、各ドメイン欠失変異蛋白とヒト血清由来の $\beta 2$ -G P Iを用いた競合法により、 $\beta 2$ -G P Iのカルジオリピンへの結合部位の検討結果を示したものである。発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳述する。

1) 定義

本明細書において、特にことわらない限り、以下の用語は下記の定義のとおりである。

「抗リン脂質抗体」とは、抗リン脂質抗体症候群

(S L Eに代表される自己免疫疾患、あるいは血栓症、神経症、習慣性流産、血小板減少などの症状を呈する一群の疾患)の患者血清中に出現する自己抗体を意味する。

「 $\beta 2$ -G P I中のドメイン」とは、 $\beta 2$ -G P I中の構造上一つのまとまりを示す領域を意味し、図1示すように、ヒト $\beta 2$ -G P Iは五つのドメインを有しており、N末から順番にドメインI、ドメインII、ドメインIII

I、ドメインIV及びドメインVと命名されている。

「 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vと同一のアミノ酸配列

を含有するポリペプチド」とは、 $\beta 2$ -G P Iがヒト由来のものである場合には、第 1 図に示される 1 8 6 番目のシステイン残基から 2 4 1 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有するポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vとドメイン Vと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド」とは、 $\beta 2$ -G P Iがヒト由来のものである場合には、第 1 図に示される 1 8 6 番目のシステイン残基から 3 2 6 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有するポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン Vと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド」とは、 $\beta 2$ -G P Iがヒト由来のものである場合には、第 1 図に示される 1 8 6 番目のシステイン残基から 2 4 1 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有し、かつ 2 4 5 番目のシステイン残基から 3 2 6 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでいないポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチド」とは、たとえば、ポリペプチド中のヒト $\beta 2$ -G P I のドメインと同一のアミノ酸配列を有している部分が、

~~アミノ酸の欠除、置換及び／または追加によりアミノ酸~~

配列が部分的に相違していても、抗リン脂質抗体の測定においては差異を及ぼさないようなポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。このようなポリペプチドとしては、ヒト以外のウシ、ブタなどの各種動物、特に哺乳動物に由来する $\beta 2$ -G P Iの特定のドメインと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを例示することができる。

2) 本発明方法及びキット

10 本発明方法は、 $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用すること
15 を特徴とするものである。このような本発明方法の具体的な態様は、下記の三つに分類される。

①方法 1:

担体にリン脂質を結合させた固相試薬と $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法に
20 おいて、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vとドメイン Vと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

②方法 2:

25 担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサ

サンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、

- 5 部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

③方法3：

- 10 極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインI VとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

(1) 本発明の方法1及びそれに使用するキット

- 15 本発明の方法1は、 $\beta 2$ -G P I中のドメインVにリン脂質との結合部位が存在すること、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメインI Vを中心とする構造であること、及びこのエピトープは通常隠れているが、ドメインVがリン脂質など結合することにより構造変化を起こし、抗体が認識できるようになるという知見を利用したものであり、
- 20 担体にリン脂質を結合させた固相試薬と $\beta 2$ -G P I中のドメインI VとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても
- 25 機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とし

ている。

リン脂質としては、陰性荷電を有するものであれば特に限定されない。具体的には、カルジオリピン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジル酸などのグリセロリン脂質を例示することができる。

リン脂質を結合させる担体としては、リン脂質を結合できるものであれば特に限定されない。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレンー無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂を例示することができる。担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じて適当な形状の担体を適宜選択すればよい。

リン脂質と担体との結合は、物理的吸着法、イオン結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法 1 に使用するポリペプチドは、 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドであり、該ポリペプチドにおける $\beta 2$ -G P I とは、哺乳動物由来の $\beta 2$ -G P

Iを例示することができ、特に第1図に示されるヒト

$\beta 2$ -G P Iを好適なものとして例示することができる。

このようなポリペプチドは、ポリメラーゼ鎖反応法
(polymerase chain reaction ; P C R 法)を用いてヒ
5 ト $\beta 2$ -G P I中の必要なドメインを含有する遺伝子を合
成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで
組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細
胞へ感染させて目的とするポリペプチド(タンパク質)
を生産する方法により取得することができる。

10 ヒト $\beta 2$ -G P Iの c D N Aライブラリーは、ヒト肝癌
細胞である H e p G 2細胞などを用いて常法により調製
することができる。また、H e p G 2細胞の c D N Aラ
イブラリーは既に市販されており、この市販品を原料と
して使用することもできる(カタログナンバー 9 3 5 2
15 0 2 ; 製造: ストラタジーン社, 販売: フナコシ(株)
社)。さらに、上述したようにヒト $\beta 2$ -G P Iの全塩基
配列は既に報告されており(Int. Immunol., 3, 1217-
1221(1991)、Biochem. J., 277, 387(1991)、Gene,
108, 293(1991))、この配列に基づき化学的に合成して
20 もかまわない。

このようなヒト $\beta 2$ -G P Iの c D N Aライブラリーを
用い、P C R法によりドメイン I Vとドメイン Vを少な
くとも含む遺伝子を調製する。P C R法による目的とす
る遺伝子の調製は周知であり、その具体的一例は実施例
25 に記載したとおりである。また、調製した遺伝子中に翻

訳開始コドン及び／または翻訳終始コドンが存在しない

場合にはそれらのコドンを遺伝子中に人為的に導入してもかまわない。

- このようにして調製した遺伝子のバキュロウイルスを用いた発現法も公知の方法を適宜応用することにより実施することができる。すなわち、バキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に調製した上記の遺伝子を挿入して組換え型バキュロウイルスを作製し、これを発現ウイルスベクターとして使用する。
- 10 組換え型バキュロウイルスを調製する際に使用するウイルスは、バキュロウイルスに分類されるものであればいずれのものであってもよい。具体的には、オートグラフ・カルフォルニカ (*Autographa Californica*、ATCC VR-1344 以下AcNPVと略す)、
- 15 ボンビックス・モリ (*Bombyx mori*) などの核多角体病ウイルスが好適である。
- バキュロウイルスは長鎖のウイルスDNA (たとえば、AcNPVのウイルスDNAは130Kbもある) を有し、発現したい遺伝子を発現制御領域 (プロモーターな
- 20 ど) の下流に直接挿入して発現ウイルスベクターを構築するのは不可能である。そこで、手順としては、まず遺伝子発現制御領域を含むウイルスDNA断片を切り出し、これを大腸菌などを宿主とするプラスミドにクローニングしてトランスファー (転移) ベクターを調製する。次
- 25 ぎに、この転移ベクターに発現目的とする遺伝子を含む

DNA断片をバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下

の適当な箇所に挿入し、これを野生型バキュロウイルス
DNAと共に昆虫細胞にコートランスフェクトし、相同
的組み換えによって目的とするドメインを含む遺伝子が
5 バキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に挿入されて
いる組換え型バキュロウイルスを調製する。

組換え型バキュロウイルスを調製するのに使用する転
移ベクターは、少なくとも相同的組換えのための領域、
遺伝子発現制御領域およびクローニングサイトをその構
10 成要素として含有する。

相同的組換えのための領域としては、相同的組換えを
起こす機能を有するものであれば制限されない。通常は
バキュロウイルスのDNA配列の一部またはそれに相
当するものが使用され、特に他のDNA断片の挿入によ
15 り不活化されてもウイルスの増殖に影響を及ぼさない領
域のものが好ましい。このようなバキュロウイルスの増
殖に非必須なDNA領域としては、たとえばポリヘドリン
遺伝子 (science, 219, 715-721(1983)) の領域など
を例示することができ、このポリヘドリン遺伝子領域を
20 相同的組換えを起こすように、たとえば、クローニング
サイトの両側に配置する。

遺伝子発現制御領域としては、組換え型バキュロウイ
ルスを経験細胞に感染させた時に目的の遺伝子を発現さ
せることのできるものであれば特に限定されない。たと
25 えば、バキュロウイルスのポリヘドリン蛋白をコードす

る遺伝子のプロモーター、10Xポリペプチドをコード

する遺伝子のプロモーター、basic protein のプロモーターなどの各種プロモーターを含有する領域を使用することができる。遺伝子発現制御領域としてポリヘドリン

5 遺伝子のプロモーターを用いる場合、発現量をより高くするために開始コドンの一部を含むその上流の5' 非翻訳領域を完全に残し、更に3' 側のポリヘドリン遺伝子の余剰な部分を全て取り除いた形で使用するのが好ましい (J.Gen.Virol., 68, 1233-1250(1987), 特開平1-2

10 85198号)。

クローニングサイトは、プロモーターなどの遺伝子発現制御領域の下流の適当な箇所に発現目的のDNA断片を挿入するためのものであり、たとえば、制限酵素認識配列を含む適当なリンカーを常法にしたがって遺伝子発

15 現制御領域の下流の適当な箇所に配置すればよい。

このような条件を満足する転移ベクターとしては、たとえばpAc373、pAcYM1などが例示でき、特にpAcYM1が好適である。これらの転移ベクターはいずれも公知の方法にしたがって調製することができる

20 (たとえば、特開平1-285198号公報、Mol.Cell. Biol., 3, 2156(1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404(1985)、Nature, 315, 592(1985)、J.Gen. Virol., 68, 1233-1250 (1987)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)、実験医学、第7巻、146頁(1989))。

25 このような転移ベクターに上記のPCR法にて調製し

た遺伝子を挿入し、この転移ベクターDNAと野生型バ

キュロウイルスDNAとを昆虫細胞にコートランスフェ
クトし、相同的組み換えによって発現目的のドメインを
を含む遺伝子がバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域
5 下に挿入されている組換え型バキュロウイルスをスクリ
ーニングする。

野生型バキュロウイルスとしては、転移ベクターを調
製する際に使用したウイルスと同じものを使用すればよ
く、ウイルスからのDNAの調製は常法により行うこと
10 ができる。また、組換え型ウイルスの選別を簡易にする
ため、ウイルスDNAの組換え箇所に β -ガラクトシダ
ーゼをコードするlacZ遺伝子を挿入しておくことが
好ましい。このようなlacZ遺伝子を挿入したウイル
スDNAは既に市販されているので（ファーミンジェン
15 社などから発売されている）、それを使用してもかまわ
ない。

ウイルスDNA及び転移ベクターDNAを感染させる
細胞としては、使用するウイルスに応じて適宜選定して
使用する。たとえば、ウイルスとしてAcNPVを使用
20 する場合、感染させる細胞としてはスポドプテラ・フル
ギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞などの夜盗蛾
由来の細胞を使用することができる。

コートランスフェクション及び組換え型バキュロウイ
ルスのスクリーニングは常法に従って操作することがで
25 きる（たとえば、Texas Agricultural Experiment

Station Bulletin No1555 Texas A&M University(1987)、

特開昭 6 0 - 3 7 9 8 8 号、特開昭 6 1 - 5 7 8 7 号参
照)。

上記のようにして調製した組換え型バキュロウイルス
5 を昆虫細胞に感染させ、これを培養し、培養物中から目
的とするポリペプチド(タンパク質)を採取する。

組換え型バキュロウイルスを感染させる細胞としては、
組換え型バキュロウイルスが増殖可能なものであれば特
に制限されない。たとえば、AcNPVを基に組換え型
10 バキュロウイルスを作製した場合、組換え型ウイルスを
感染させる細胞としてはスポドプテラ・フルギペルダ
(*Spodoptera frugiperda*) 細胞などの夜盗蛾由来の細
胞が好ましい。

細胞を培養する培地としては、グレース培地、SF-
15 900培地、イーエックスセル400培地などの昆虫細
胞の培養に常用されているものを使用すればよい。また、
血清を含有したもの、血清を含有していないもののいづ
れも使用可能であるが、目的とするポリペプチドの精製
を容易にするため、培養当初から無血清培地を使用する
20 か、培養初期は血清含有培地を使用し、培養24時間頃
に無血清培地に切り替えるのが好ましい。

組換え型バキュロウイルスを感染させた細胞の培養は、
常法によって行うことができ、たとえば、20～30℃
でポリペプチドが充分に発現される時間(60～72時
25 間程度)培養すればよい。

培養物から目的とするポリペプチドの採取は蛋白の精

製法として常用されている方法を適宜組み合わせることにより実施することができる。その中でも特に、抗 $\beta 2$ -G P I抗体またはカルジオリピンなどのリン脂質を用いるアフィニティークロマトグラフィー法が効果的である。

本発明の方法1は、このようにして得られた $\beta 2$ -G P I中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと担体にリン脂質を結合させた固相試薬とを使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬とポリペプチドを使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、反応様式による分類としては競合反応法と非競合反応法が知られているが、本発明においてはいずれの方法も採用できる。また、検出方法による分類としては抗原抗体反応の結果を直接検出する非標識法（ネフェロメトリーなど）となんらかのマーカーを使用して検出する標識法が知られているが、本発明はどちらの方法であってもよい。さらに、B F分離を行う必要のあるヘテロジニアス法と必要のないホモジニアス法が知られており、本発明にはいずれの方法を適用してもよい。すなわち、これら公知の一般法の中から本発明の測定法の目的に適合する方法を適宜選択すればよい。

なお、一般的方法の詳細については、たとえば以下の文献に詳細に記載されている。

①入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（株）講談社、

昭和54年5月1日発行

- ②石川栄治ら編「酵素免疫測定法（第2版）」（株）医学書院、1982年12月15日発行
- ③臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」臨床病理刊行会、1983年発行
- ④「バイオテクノロジー事典」（株）シーエムシー、1986年10月9日発行
- ⑤「Methods in ENZYMOLOGY Vol.70」（Immunochemical techniques (Part A)）
- ⑥「Methods in ENZYMOLOGY Vol.73」（Immunochemical techniques (Part B)）
- ⑦「Methods in ENZYMOLOGY Vol.74」（Immunochemical techniques (Part C)）
- 15 ⑧「Methods in ENZYMOLOGY Vol.84」（Immunochemical techniques (Part D:Selected Immunoassay)）
- ⑨「Methods in ENZYMOLOGY Vol.92」（Immunochemical techniques (Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)）
- 20 （⑤～⑨はアカデミックプレス社発行）

たとえば、ELISA法を例に挙げ、本発明の方法1を具体的に説明すれば、まず、リン脂質を結合させたプレート（各ウェルに $\beta 2$ -GPI中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを

25 反応させ、次に被検試料（たとえば、血液、血清など）

を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を反応させる。

- 次に、ウェルを洗浄後、酵素標識抗免疫グロブリン抗体
(たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗 Ig G 抗体など)
を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に
5 基質 (ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及
びテトラメチルベンチジンなど) を添加し、いずれかの
相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成し
ておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗
体の量を算出すればよい。なお、反応に使用するポリペ
10 プチドは、被検液と同時に反応させても構わない。

- 本発明の方法 1 を実施するためのキットも、上述の担
体にリン脂質を結合させた固相試薬と $\beta 2$ -G P I 中のド
メイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有す
るポリペプチドを構成試薬として包含することの特徴と
15 しており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致す
るように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記 E L I S A 法を実施するためのキット
は下記の試薬から構成される。

- ① 担体にリン脂質を結合させた固相試薬
- 20 ② $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V とドメイン V と同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチド
- ③ 酵素標識抗免疫グロブリン抗体
- ④ 基質溶液
- ⑤ 既知濃度の標準抗体液

- 25 (2) 本発明の方法 2 及びそれに使用するキット

本発明の方法2は、抗リン脂質抗体症候群由来の自己

抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメイン
I Vを中心とする構造であり、自己抗体の測定には必ず
しもドメインVは必要でないという知見を利用したもの
5 であり、 $\beta 2$ -G P I中のドメインI Vと同一のアミノ酸
配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を
欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違し
ていても機能的に同等なポリペプチドを担体に結合させ
た固相試薬を使用することを特徴とする方法である。

10 方法2に使用するポリペプチドは、 $\beta 2$ -G P I中のド
メインI Vと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイ
ンVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、
またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポ
リペプチドであり、該ポリペプチドにおける $\beta 2$ -G P I
15 とは、哺乳動物由来の $\beta 2$ -G P Iを例示することができ、
特に第1図に示されるヒト $\beta 2$ -G P Iを好適なものとし
て使用することができる。

このようなポリペプチドは、前述の本発明の方法1と
同様に、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain
20 reaction；PCR法）を用いてヒト $\beta 2$ -G P I中の必要
なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子
をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製
し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させ、目的と
するポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により
25 取得することができる。

ポリペプチドを結合させる担体としては、上記ポリペ

プチドを結合できるものであれば特に限定されない。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンー
ジビニルベンゼン共重合体、スチレンー無水マレイン酸
5 共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリ
ロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレ
ートなどの合成樹脂を例示することができる。

また、上記担体は、極性基をその表面に導入したものであっても構わない。ここで、極性基としては、水酸基、
10 カルボキシル基、カルボニル基、ホルミル基、イミノ基、
酸素ラジカルなどの酸素原子に由来するものが好ましい。

このような担体は、タンパク質の吸着性の高い疎水性表面を有する合成樹脂、より具体的にはポリ塩化ビニル、
ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、
15 スチレンー無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリア
クリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、
ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂に、極性基
を常法により化学的に導入することにより調製することが
できる。また、上記の疎水表面を有する合成樹脂に紫
20 外線、放射線（ x 線、 β 線、 γ 線など）、荷電粒子（プロ
トン、 α 粒子など）などを照射する方法、または上記
の疎水表面を有する合成樹脂をオゾンで処理する方法に
よっても上記担体を調製することができる。

このような極性基をその表面に導入した担体の具体例
25 としては、EBプレート（ラボシステムズ社製）、Hタ

イブプレート、Cタイププレート（住友ベークライト社製）、マキシソーププレート（マシク社製）などを例示することができる。

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、
5 ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じた適宜な形状の担体を選択すればよい。

ポリペプチドと担体との結合は、物理的吸着法、イオン
10 結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法2は、このようにして得られた、 $\beta 2$ -GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリ
15 ペプチドを担体に結合させたものを固相試薬として使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬を使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、ELISA法を例に挙げ、本発明の方法2
20 を具体的に説明すれば、まず、 $\beta 2$ -GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた上記の固相プレートの各ウェルに被検試料（たとえば、血液、血清など）を添加し、ポリペプチド
25 と被検液中の抗体を反応させる。次に、ウェルを洗浄後、

酵素標識抗免疫グロブリン抗体（たとえば、ペルオキシ

ダーゼ標識抗IgG抗体など）を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に基質（ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及びテトラメチルベンチジンなど）を添加し、いずれかの相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成しておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗体の量を算出すればよい。

本発明の方法2を実施するためのキットも、上述のβ2-GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた固相試薬を構成試薬として包含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記ELISA法を実施するためのキットは下記の試薬から構成される。

①β2-GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた固相試薬

②酵素標識抗免疫グロブリン抗体

③基質溶液

④既知濃度の標準抗体液

(3) 本発明の方法3及びそれに使用するキット

本発明の方法3は、β2-GPI中のドメインVにリン脂質との結合部位が存在すること、抗リン脂質抗体症候

群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部

- 位）はドメインⅠⅤを中心とする構造であること、この
エピトープは通常隠れているが、ドメインⅤがリン脂質
など結合することにより構造変化を起こし、抗体が認識
5 できるようになること、及び極性基をその表面に導入し
た担体がリン脂質の代わりになり得るという知見を利用
したものであり、 $\beta 2\text{-GPI}$ 中のドメインⅠⅤとドメイ
ンⅤと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまた
はそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペ
10 プチドを極性基をその表面に導入した担体に結合したも
のを固相試薬として使用することを特徴としている。

- 本発明の方法3で使用するポリペプチドは、 $\beta 2\text{-GPI}$
Ⅰ中のドメインⅠⅤとドメインⅤと同一のアミノ酸配列
を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドにおけ
15 る $\beta 2\text{-GPI}$ とは、哺乳動物由来の $\beta 2\text{-GPI}$ を例示す
ることができ、特に図1に示されるヒト $\beta 2\text{-GPI}$ を好
適なものとして使用することができる。

- このようなポリペプチドは、前述の本発明の方法1と
同様に、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain
20 reaction；PCR法）を用いてヒト $\beta 2\text{-GPI}$ 中の必要
なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子
をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製
し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させ、目的と
するポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により
25 取得することができる。

ポリペプチドを結合させる担体としては、前述したような極性基をその表面に導入したものであれば特に限定されない。

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、
5 ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じた適宜な形状の担体を選択すればよい。

ポリペプチドと担体との結合は、物理的吸着法、イオン
10 結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法 3 は、このようにして得られた、 $\beta 2$ -GPI 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入
15 した担体に結合させたものを固相試薬として使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬を使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、ELISA 法を例に挙げ、本発明の方法 3
20 を具体的に説明すれば、まず、 $\beta 2$ -GPI 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相プレートの各ウェルに被検試料（たとえば、血液、血清など）を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を
25 反応させる。

次に、ウェルを洗浄後、酵素標識抗免疫グロブリン抗体

- (たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗IgG抗体など)
を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に
基質(ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及
5 ビテトラメチルベンチジンなど)を添加し、いずれかの
相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成し
ておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗
体の量を算出すればよい。

- 本発明の方法3を実施するためのキットも、上述の
10 β 2-GPI中のドメインIVとドメインVと同一のアミ
ノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に
導入した担体に結合させた固相試薬を構成試薬として包
含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用
した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。
15 たとえば、上記ELISA法を実施するためのキット
は下記の試薬から構成される。

- ① β 2-GPI中のドメインIVとドメインVと同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表
面に導入した担体に結合させた固相試薬
20 ② 酵素標識抗免疫グロブリン抗体

③ 基質溶液

④ 既知濃度の標準抗体液

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

- 25 (1) C末端側からのドメイン欠失遺伝子の作製

ポリメラーゼ鎖反応 (polymerase chain reaction ;

PCR) を用いて様々なドメインを欠失させたヒト $\beta 2$ -
GPI の遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウ
イルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換
えウィルスを昆虫細胞へ感染させて目的のドメイン欠失
変異蛋白を生産させた。

5 番目のドメイン (ドメイン V) を欠失した遺伝子の
作製のため、まず PCR に用いるプライマーを設計する。
本実施例においては、鋳型として用いたヒト $\beta 2$ -GPI
10 遺伝子はバキュロウィルス発現系で組換えウィルスの作
製で用いる転移ベクター (pAcYM1) の BamHI
部位に挿入されているため、ヒト $\beta 2$ -GPI 遺伝子の
5' 非翻訳領域の上流に位置し、転移ベクター内に存在
するポリヘドリン開始コドンのすぐ上流の配列を 5' プ
15 ライマーとして用いた。

この結果、5' プライマーの配列は下記のとおりとな
り、PCR で増幅された DNA 断片の片側 (目的の遺伝
子の 5' 側) に BamHI 部位を設ける事ができる。

5'-GTAAT AAAAA AACCT ATAA T-3'

20 また、ヒト $\beta 2$ -GPI は第 1 図に示すように、ドメイ
ン分子内の二つの S-S 結合 (ドメイン V のみ三つ) に
よって巻き寿司様の二次構造を形成しており、ドメイ
ンの単位は二つの S-S 結合ごとに区切ることができる。
それで、3' プライマーの設計は、ドメイン IV の末端
25 部分からドメイン V の頭までの配列に相補的な配列、塩

基配列から見れば、開始コドン A T G の A を + 1 とした

場合、+ 7 6 3 から + 7 9 2 までの 3 0 個の塩基に相補的な配列を利用した。さらに、ドメイン I V の最後のシステインの後に終止コドンを入れて該コドンで翻訳が停止するようにするとともに、得られた遺伝子を転移ベクター等にクローン化しやすいように終止コドンのすぐ下流に E c o R I 部位を設けた。この結果、3' プライマーの配列は下記のとおりとなり、P C R によって増幅された D N A 断片は B a m H I と E c o R I によって切り出すことができる。

5' -ACAGA ATTCT TAACA ACTTG GCATG GCAGA-3'

次に、化学合成した上記の 2 つのプライマーを鋳型として、 β 2-G P I 遺伝子を組み込んだ p A c Y M 1 を用いて P C R を行った。P C R を行うためのキットは市販されており (GeneAmpTM PCR Reagent Kit with AmpliTaqTM DNA polymerase, 宝酒造販売、ホフマンローロッシュ社製造)、P C R の具体的操作はそのキットに添付している説明書に従って行った。

この様にして増幅された D N A 断片は、0. 9 % の濃度のアガロース電気泳動により分離し、D N A 断片を含むアガロース部分を回収、精製した。アガロースから目的の D N A 断片を回収する方法としては、そのアガロース断片を一度凍らせた後に融解し、滲み出てくる水溶液を回収する方法によっても行うことができる。また、このためのキットも幾つか市販されており (DNACELL、

草野科学器械製作所製造、第一化学薬品（株）販売、

GENECLEAN II、フナコシ（株）販売）、該キットを利用して目的のDNA断片を回収、精製することもできる。

通常、PCRによって増幅されたDNA断片の末端は
5 平滑ではなく、5'側にAが突出しているため、T4
DNAポリメラーゼを使用したキット（DNA Blunting
Kit、宝酒造製造・販売）を用いて平滑化した。

平滑化されたDNA断片は、Sma I切断された
pUC118断片とライゲーション反応を行い、pUC
10 118のSma I部位に一旦クローニングした。ライゲ
ーション反応は、T4リガーゼを使用したキット（DNA
Ligation Kit、宝酒造製造・販売）を用いて行った。

この様にして増幅・クローンされたDNA断片をDI
-IV遺伝子（第2図）と呼ぶ。

15 用いる3'プライマーを替えることにより、上記と異
なるドメイン欠失遺伝子を作製する事ができる。たと
えば、3'プライマーとして+583から+612までの
配列を基にし、これに終止コドン及びEcoRI部位を
導入した下記の塩基配列を有する3'プライマーを用い
20 て、上記と同様の方法にてドメインIVとドメインVの
両ドメイン欠く遺伝子（DI-III遺伝子：第3図）
を作製した。

5'-TTTGA ATTCT CAGCA TTCTG GTAAT TTAGT-3'

（2）N末端側からのドメイン欠失遺伝子の作製

25 N末端側からのドメイン欠失遺伝子もC末端側からの

ドメイン欠失遺伝子の作製と同様の方法にて行うことが

できるが、N末側の遺伝子配列を単純に欠失させると分泌のためのリーダー配列も失ってしまう。よって、目的の蛋白を分泌発現させるためにリーダー配列をコードしているDNA断片とN末側のドメインを欠失している遺伝子断片とをアミノ酸の読みとり枠が一致するように連結する作業が必要である。

まず、リーダー配列をコードするDNA断片をPCRを用いて調製する。これは、C末側からのドメイン欠失
10 遺伝子の作製と全く同様の作業によって行うことができる。すなわち、PCRに用いる5'プライマーは前記のものと同一ものを用いた。また、3'プライマーはリーダー配列からドメインIにかけての領域(+49から+72)に相補的な配列を基にして、これにEcoRI部
15 位を導入した下記の配列のものを用いた。

5'-GGGAG AATTC CGTCC TGCAA TAGC-3'

各プライマーを用いてPCRを行い、リーダー配列を含む断片を増幅した後、前述の方法で目的のDNA断片を精製し、pUC118へのクローニングを行った。

20 次に、N末側のドメインを欠失した遺伝子のPCRによる作製においては、鑄型として β 2-GPIのcDNAがpUC118にクローンされているものを用い、3'プライマーとしてマルチクローニングサイトのHindIII部位の外側の配列を有する下記のものを用いた。

25 通常、塩基配列の決定に良く使用されるM13プライマ

—もしくはユニバーサルプライマー—等も同様の領域の配

列を用いており、それらを使用する事もできる。

5' -CCCAG TCACG ACGTT GTAAA-3'

5' プライマーは、各々欠失させるドメインからその
5 次のドメインへかけての領域の配列を利用し、シグナル
配列とアミノ酸の読みとり枠が一致するように

E c o R I 部位を導入した。発現させたいドメインと

5' プライマーの塩基配列及び利用した塩基配列の位置
は下記のとおりである。

10 ・ドメイン I を欠失する遺伝子 (D I I - V 遺伝子 : 第
4 図)

5' -ACTCT GAATT CTACA CCCAG AGTAT GT-3' (+226から
+252まで)

・ドメイン I 及び I I を欠失する遺伝子 (D I I I - V
15 遺伝子 : 第 5 図)

5' -GTCTG GAATT CCATC ATCTG CCCTC CA-3' (+406から
+432まで)

・ドメイン I、I I 及び I I I を欠失する遺伝子 (D I
V - V 遺伝子 : 第 6 図)

20 5' -CCGAA TTCCA GGGAA GTAAA ATGCC CA-3' (+592から
+618まで)

上記の 5' プライマー及び 3' プライマーを用いて
P C R を行い、前述した方法と全く同様の操作で目的の
D N A 断片を回収・精製して p U C 1 1 8 へクローン化

25 した。

(3) N末、C末両側のドメインを欠失した遺伝子の作

製

- 5 D I I - V 遺伝子を鋳型として、C末側のドメインを欠失した遺伝子の作製方法と同様の操作を行う事により、ドメイン I 及びドメイン V を欠失した遺伝子を作製した。これは、後述の p V L D 2 5 を鋳型として、5' プライマー及び 3' プライマーは前述の D I I - V 遺伝子を作製した時と同一のものをを用いて P C R を行い作製した。この遺伝子を D I I - I V 遺伝子と呼ぶ。

10 (4) 各欠失遺伝子の転移ベクターへの導入

各ドメイン欠失遺伝子をバキュロウィルスに導入して昆虫細胞において発現させるため、p U C 1 1 8 より目的遺伝子を切り出し、転移ベクター p V L 1 3 9 3 へクローンし直した。

- 15 すなわち、C末側のドメイン欠失遺伝子 (D I - I V 及び D I - I I I) の場合、B a m H I と E c o R I で切り出せるようにプライマーを設計してあるので、同制限酵素で切断し、目的の断片をアガロース電気泳動によって回収・精製した。そして、転移ベクターである
- 20 p V L 1 3 9 3 の B a m H I 部位と E c o R I 部位の間に挿入した。それぞれ作製した組換えプラスミドを p V L D 1 4 及び p V L D 1 3 と呼ぶ。

- また、N末側からのドメインの欠失遺伝子 (D I I - V, D I I I - V 及び D I V - V) の場合、まずリーダー
- 25 一配列を含む断片を先に p V L 1 3 9 3 へ移した。すな

わち、リーダー配列を含む断片はやはり B a m H I と

- E c o R I で切断できるように設計されているので、同断片として切り出し、p V L 1 3 9 3 の B a m H I - E c o R I 部位間に挿入した。このプラスミドを
- 5 p V L L S 1 と呼ぶ。次に、N 末側からのドメイン欠失遺伝子 (D I I - V, D I I I - V 及び D I V - V) は、前述のように E c o R I と B a m H I で切断でき、E c o R I 部位でリーダー配列とアミノ酸の読みとり枠が一致するように設計されている。よって、E c o R I
- 10 と B a m H I で切り出し、アガロース電気泳動によって断片を回収・精製した後、p V L L S 1 の E c o R I 部位と B g 1 I I 部位の間に挿入した。この結果作製した組換えプラスミドをそれぞれ p V L D 2 5、p V L D 3 5 及び p V L D 4 5 と呼ぶ。
- 15 N 末及び C 末の両側のドメインを欠失した遺伝子 (D I I - I V) の場合はリーダー配列を含んだまま B a m H I で切り出せるので、同酵素で切断後、アガロース電気泳動によって目的の D N A 断片を回収・精製した。そして、p V L 1 3 9 3 の B a m H I 部位と B g 1
- 20 I I 部位の間に挿入した。この結果作製された組換えプラスミドを p V L D 2 4 と呼ぶ。
- これら p V L D 1 3, 1 4, 2 5, 3 5, 4 5, 2 4 をバキュロウィルス D N A とともに昆虫培養細胞 s f 9 (Spodoptera frugiperda cell: ファーミンジェン社な
- 25 どから入手可能) にコートランスフェクションを行った。

トランスフェクション後、3日目の培養上清からプラー

クアッセイにより組換えウィルスを選択した。まず、培養上清を10倍、100倍及び1000倍希釈し、これを直径35mmのディッシュに用意した 1×10^6 個の昆虫細胞に接種した。1時間吸着させた後にウィルス液を捨て、重層寒天培地を2ml加えた。この寒天培地は、予め蒸留水で3%に溶かし滅菌した低融点寒天 (Sea Plaque) を10% FCSを添加した培養液で1%に希釈しておいたものである。重層した培地が固まった後、10mlの培養液をさらに重層する。

27℃で3日間培養後、0.01% ニュートラルレッド及び4% X-galを加えたPBSを1.0ml加えて染色し、プラークを判別し易くする。非組換えウィルス由来のプラークは β -ガラクトシダーゼの産生により青色を呈するのに対し、組換えウィルスのプラークは β -ガラクトシダーゼをコードしている遺伝子とドメイン欠失遺伝子が組み換わっているために白色になる。組換えウィルスと思われる白色のプラークをさらに3回ほどプラークアッセイを繰り返して、純化したクローンを得た。この組換え型ウィルスをMultiplicity of Infection (M.O.I.) = 10で 1×10^7 細胞のsf細胞に感染させて、75ml容のプラスチック・フラスコで72時間、10%のウシ胎児血清を含んだグレース培地で培養した。

25 培養後、培養液を5000xgの条件で遠心して培養

上清を得た。また、遠心により得られた細胞にPBSと

電気泳動用緩衝液とをおのおの50 μ l加えて100℃
で10分間加熱して細胞抽出液を調製した。培養上清及

び細胞抽出液(各10 μ l)をSDS-PAGE(ポリ

5. アクリルアミドゲル電気泳動)処理に付し、泳動後クマ
シーブリリアントブルー(CBB)による染色及び抗
 β 2-GPI抗血清を用いたウェスタンブロット法により
 β 2-GPIドメイン欠失変異蛋白の産生を確認した。

- その結果、CBBによる染色分析において、試料とし
10 て β 2-GPIドメイン欠失遺伝子、DIV-V、DIII
I-V、DII-V、DI-III、DI-IVを挿入
した各組換え型ウィルスの感染細胞から調製したもの
を使用した場合、分子量約20、35、38、30、38
キロダルトンの移動度の箇所に野生型バキュロウィルス
15 の感染細胞から調製した試料では検出できない特異的な
バンドが検出された。また、ウェスタンブロット法によ
る分析により、抗 β 2-GPI抗血清はドメイン欠失遺伝
子を挿入した組換え型ウィルスの感染細胞から調製した
試料に特異的に出現したバンドにのみ反応することから、
20 これらの蛋白が、ドメイン欠失変異蛋白であることが確
認された。

次に、組換え型ウィルスを昆虫細胞に感染させた後、
一定時間毎に培養液を分取し、ドメイン欠失変異蛋白の
産生の経時変化をウェスタンブロット法によって解析し

- 25 た。その結果、培養上清、細胞抽出液の何れも試料にお

いても培養開始24時間後にドメイン欠失変異蛋白の産生が確認でき、60～72時間後が最も産生量が高かった。

(5) バキュロウィルスを用いて昆虫細胞で産生された
5 β 2-GPIドメイン欠失変異蛋白の精製

組換えバキュロウィルスを感染させた昆虫細胞培養上清からの β 2-GPIドメイン欠失変異蛋白の精製は、抗 β 2-GPIモノクローナル抗体を用いたアフィニティークラムにより行った。

10 すなわち、まずセファロースCL4B樹脂(ファルマシア社)5mlにマウス抗 β 2-GPIモノクローナル抗体Cof20またはCof23(W092/19755)を5mg結合させたアフィニティークラムを常法により調製した。そして、組換え型ウィルスをM.O.I. = 10

15 で 1×10^8 個のsf細胞に感染させ、無血清培地(SF-900、キブコ社製)を使用して72時間培養して得た上清100mlを、50mM塩化ナトリウム含有10mMリン酸緩衝液(PBS、pH7.4)2リットル(L)に対し一晩透析した後、同緩衝液にて平衡化
20 したアフィニティークラムにアプライし、蛋白を抗体に結合させた。この時、DIV-Vの場合はCof23を結合させたカラムを使用し、他のドメイン欠失蛋白(DIII-V、DII-V、DI-III、DI-IV)ではCof20を結合させたカラムを使用した。

25 次に、充分量の同緩衝液でカラムを洗浄した後、1M

グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.5) にて蛋白を溶出、回

収した。回収した蛋白画分は、直ちに PBS (pH 7.

4) 2 リットル (L) に対して一晩透析を行い、次に透
析チューブと 40 % ポリエチレングリコール (PEG)

5 溶液を用いた方法にて濃縮を行った。濃縮後、150
mM 塩化ナトリウム含有 HEPES 緩衝液 (pH 7.

2) 2 L に対し一晩透析を行い、得られた蛋白を精製標
品とした。

このような方法を用いて調製した各ドメイン欠失変異
10 蛋白の精製標品は SDS-PAGE (クマシーブルー染
色) にて分析した結果、純度 95 % 以上という極めて高
度に精製されたものであり (第 7 図)、作製した 2 種類
のアフィニティーカラムクロマトグラフィー法が極めて
効果的であることが明かとなった。また、SDS-PAGE
15 GE 分析の結果から、各ドメイン欠失蛋白は表 1 に示す
分子量であることが判明した。

表 1. 各ドメイン欠失蛋白の分子量

| | | |
|----|-------------|-------------|
| 20 | | 分子量 (kDa) |
| | D I V - V | 18.9 |
| | D I I I - V | 32.7 |
| | D I I - V | 34.5 |
| | D I - I I I | 25.6 |
| 25 | D I - I V | 36.4 |

(6) ドメイン欠失変異蛋白を用いた抗 $\beta 2$ -GPIモノ

クローナル抗体の抗原決定基 (epitope) の解析

- 得られた各種のドメイン欠失変異蛋白 (DIV-V, DIII-V, DII-V, DI-III, DI-IV) ならびに全ドメインを有するリコンビナント蛋白 (DI-V(whole)) の各溶液 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を $50 \mu\text{l}$ /ウェルずつ 96 ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社、Sプレート) の各ウェルに入れ、 4°C で一晩インキュベートした。 0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-Tween: pH 7.4) ($200 \mu\text{l}$) を用いて 3 回洗浄した後、 3% ゼラチン溶液 ($200 \mu\text{l}$) を各ウェルに入れ、更に室温で 1 時間静置した。

- ゼラチン液を除去した後、精製抗 $\beta 2$ -GPIモノクローナル抗体 (Cof-18, Cof-19, Cof-20, Cof-21, Cof-22, Cof-23) 溶液 ($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$) を $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて 1 時間静置した。PBS-Tween ($200 \mu\text{l}$) にて 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて 1 時間静置した。上記と同様に洗浄の後、発色液 (0.3 mM テトレメチルベンジジン、 0.0003% H_2O_2) $100 \mu\text{l}$ を加え、正確に 10 分反応させた。 2 N H_2SO_4 、 $100 \mu\text{l}$ を加えて反応を停止させ、 450 nm の吸光度を測定した。

結果を第 8 図に示す。この結果をより、各精製抗 $\beta 2$ -

G P I モノクローナル抗体の抗原決定基を解析したのが
第 9 図である。このように、ドメイン欠失変異蛋白を用
いることにより、各抗 $\beta 2$ -G P I 抗体の抗原決定基を容
5 易に解析することができる。

(7) ドメイン欠失変異蛋白を用いたモノクローナル抗
カルジオリピン抗体 (抗 C L 抗体 : W B - C A L - 1 :
J. Immunol., 149, 1063-1068(1992))、および抗リン脂質
抗体症候群患者血清中の自己抗体の抗原決定基
10 (epitope) の解析および自己抗体の検出

方法 1 ;

全ドメインを有するリコンビナント $\beta 2$ -G P I 蛋白
(D I - V (whole))、ならびに得られた各種のドメイ
ン欠失変異蛋白 (D I V - V, D I I I - V, D I I -
15 V, D I - I I I, D I - I V) の各溶液 ($10 \mu g /$
 $m l$) を $50 \mu l /$ ウエルずつ 96 ウエルマイクロタイ
タープレート (住友ベークライト社、S プレートおよび
C プレート) の各ウエルに入れ、 $4^{\circ}C$ で一晚インキュ
ベートした。なお、C プレートは S プレートの表面
20 に化学的にカルボキシル基を導入したものである。次に、
P B S - T w e e n ($200 \mu l$) にて 3 回洗浄した後、
3 % ゼラチン溶液、 $200 \mu l$ を各ウエルに入れ、更に
室温で 1 時間静置した。

ゼラチン液を除去した後、適宜希釈した精製モノクロ
25 ーナル抗カルジオリピン抗体 (抗 C L 抗体 : W B -

CAL-I) もしくは抗リン脂質抗体症候群患者の陽性

血清を $100\mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて1時間静置した。

PBS-Tween ($200\mu\text{l}$) にて3回洗浄し、ペルオキシダーゼで標識された抗マウスIgG抗体もしくは

- 5 は抗ヒトIgG抗体を $100\mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて1時間静置した。同様の洗浄の後、発色液 (0.3mM テトラメチルベンジジン、 0.0003% H_2O_2) $100\mu\text{l}$ を加え、正確に10分反応させた。 2N H_2

SO_4 、 $100\mu\text{l}$ を加え、反応を停止させ、 450

- 10 nmの吸光度を測定した。

精製モノクローナル抗カルジオリピン抗体 (抗CL抗体) を用い、Sプレートでの測定結果を図10に、Cプレートの測定結果を第11図に示す。また、健常人血清4例、SLE患者血清3例、梅毒患者血清3例を用いて、

- 15 Sプレートで測定した結果を図12~14に、Cプレートで測定した結果を第15~17図に示す。

その結果、カルボキシル基を導入していないプレート (S-プレート) に直接ドメイン欠失変異蛋白を抗原として固相化した場合、ドメインVを欠損したドメイン

- 20 IVを含むドメイン欠失変異蛋白で抗CL抗体が測定可能であることが明きらかとなった (第10図)。それに対し、カルボキシル基を導入したプレート (C-プレート) にドメイン欠失蛋白を固相化した場合、ヒト血清由来 $\beta 2\text{-GPI}$ を固相化した時と同様にドメインIVおよびVを有するドメイン欠失変異蛋白で抗CL抗体が測定

- 25

可能であった（第11図）。なお、ドメインVを欠失し

た蛋白であるD I - I Vでも、カルボキシル基を導入したプレート上で抗C L抗体を測定することが可能である（第11図）ことから、少なくともドメインI Vを有する変異蛋白が抗C L抗体の測定に有用であることが確認された。

また、ヒト血清を測定した場合、S L E患者では抗C L抗体と同様の挙動を示した（第16図）。しかし、健常人および梅毒患者では特徴的な抗体の結合は見られなかった。

方法2；

ウシ心臓由来のカルジオリピン（ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ エタノール溶液）を $50 \mu\text{l}$ / ウエルずつ96ウエルマイクロタイタープレート（Immulon-1、Dynatech社製）に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、全ドメインを有するリコンビナント $\beta 2$ -G P I蛋白

（D I - V (whole)）およびドメイン欠失蛋白（D I V - V, D I I I - V, D I I - V, D I - I I I, D I - I V）の各溶液（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を $100 \mu\text{l}$ / ウエルずつ各ウエルに入れ、室温にて1時間静置した。洗浄後、適宜希釈した抗カルジオリピン抗体（抗C L抗体）を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ずつ加え、30分反応させた。更に、洗浄し、ペルオキシダーゼで標識した抗マウス

I g G抗体もしくは抗ヒトI g G抗体を $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて1時間静置した。同様に洗浄の後、発色

液 (0.3 mM テトラメチルベンジジン、0.0003

% H_2O_2) $100 \mu l$ を加え、正確に 10 分反応させた。 $2N H_2SO_4$ 、 $100 \mu l$ を加え、反応を停止させ、 $450 nm$ の吸光度を測定した。

- 5 その結果を第 18 図に示す。この結果、カルジオリピンを用いる ELISA (aCL-ELISA) の系に用いた場合、少なくともドメイン V とドメイン IV を含むドメイン欠失変異蛋白を使用することにより抗 CL 抗体の結合が認められた (第 18 図)。従って、aCL-
10 ELISA の系においては、ドメイン V とドメイン IV を含むドメイン欠失蛋白を用いることで抗 CL 抗体の検出が可能であることを確認した。

(8) $\beta 2-GPI$ のリン脂質 (カルジオリピン) 結合部位の解析

- 15 方法 1 ;

ウシ心臓由来のカルジオリピン ($50 \mu g/ml$ エタノール溶液) を $50 \mu l$ / ウエルずつ 96 ウエルマイクロタイタープレート (Immulon-1、Dynatech 社製) に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、

- 20 全ドメインを有するリコンビナント $\beta 2-GPI$ 蛋白

(DI-V (whole)) およびドメイン欠失蛋白 (DIV-V, DIII-V, DII-V, DI-III, DI-IV) の各溶液 ($10 \mu g/ml$) を $100 \mu l$ / ウエルずつ各ウエルに入れ、室温にて 1 時間静置した。洗

- 25 浄後、適宜希釈した抗 $\beta 2-GPI$ 抗体を $100 \mu g$ /

m 1 ずつ加え、30分反応させた。更に、洗浄し、ペル
オキシダーゼで標識された抗マウス Ig G 抗体もしくは
ペルオキシダーゼで標識された抗ヒト Ig G 抗体を 10
0 μ l ずつ入れ、室温にて1時間静置した。同様の洗浄
5 の後、発色液（0.3 mM テトラメチルベンジジン、0.
0003% H_2O_2 ）100 μ l を加え、正確に10
分反応させた。2N H_2SO_4 、100 μ l を加え、
反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

結果を第19図に示す。その結果、ドメイン欠失変異
10 蛋白のうち、リン脂質（カルジオリピン）と結合し得た
のはドメイン V を有する蛋白であった。

方法 2 ;

ウシ心臓由来のカルジオリピン（50 μ g / ml エタ
ノール溶液）を 50 μ l / ウエルずつ 96 ウエルマイク
15 ロタイタープレート（Immulon-1、Dynatech 社製）に入れ、
減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、
インヒビターとして全ドメインを有するリコンビナント
 β 2-GPI 蛋白（DI-V (whole)）およびドメイン欠
失変異蛋白（DIV-V, DIIV-V, DII-V,
20 DI-III, DI-IV）の各溶液（0-50 μ g
/ ml）を 5 μ g / ml のビオチン化ヒト血清由来 β 2-
GPI（全量 100 μ l / ウエル）と、室温にて1時間
インキュベートした。洗浄後、アビジン化ペルオキシダ
ーゼを 100 μ l / ウエルずつ加え、15分反応させた。
25 洗浄の後、発色液（0.3 mM テトラメチルベンジジン、

0.0003% H_2O_2) 100 μ lを加え、正確に

10分反応させた。2N H_2SO_4 、100 μ lを加え、反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。

結果を第20図に示す。その結果、ドメインVを有するドメイン欠失蛋白がビオチン化ヒト血清由来 β 2-GPIのリン脂質に対する結合を強く阻害することが確認された。

以上の解析の結果、① β 2-GPIの第5ドメイン(ドメインV)にリン脂質との結合部位が存在すること、②抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ(抗体認識部位)は第4ドメイン(ドメインIV)を中心とする構造であること、③このエピトープは通常隠れているが、ドメインVがリン脂質など結合することにより、構造変化を起こし、抗体が認識できるようになることが確認された。

産業上の利用可能性

β 2-GPI中の特定のドメインを含有するポリペプチドを使用することにより、感染症由来の抗カルジオリピン抗体の影響を受けることなく、抗リン脂質抗体症候群由来に自己抗体(抗カルジオリピン抗体)のみを特異的に測定することができるようになった。このような特徴は、従来法においては β 2-GPIの存在下及び非存在下の二種の条件下で測定を行うことにより初めてその分別定量が可能であったのに比べて、極めて有利である。

請求の範囲

1. β 2-グリコプロテイン I を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロ
- 5 ロテイン I の代わりに、 β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。
- 10 2. β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドをキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第 1 項記載の方法を実施するためのキット。
- 15 3. ポリペプチドが、ヒト由来の β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第 1 項記載の測定法または請求の範囲第 2 項記載のキット。
- 20 4. 担体にリン脂質を結合させた固相試薬と β 2-グリコプロテイン I を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロテイン I の代わりに、 β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド
- 25 またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗

体の測定法。

5. β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリ
- 5 ペプチド、および担体にリン脂質を結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第 4 項記載の方法を実施するためのキット。
6. ポリペプチドが、ヒト由来の β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V 及びドメイン V と同一のアミノ酸
- 10 配列を含むものである、請求の範囲第 4 項記載の測定法または請求の範囲第 5 項記載のキット。
7. 担体に β 2-グリコプロテイン I を結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロテイン I の代わりに、 β
- 15 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。
- 20 8. β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを担体に結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含むことを特徴
- 25 とする、請求の範囲第 7 項記載の方法を実施するための

キット。

9. ポリペプチドが、ヒト由来の $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたものである、請求の範囲第 7 項記載の測定法または請求の範囲第 8 項記載のキット。

10. 極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -グリコプロテイン I を結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I の代わりに、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。

- 15 11. $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを極性基を表面に導入した担体に結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含有することを特徴とする、請求の範囲第 10 項記載の方法を実施するためのキット。

- 20 12. ポリペプチドが、ヒト由来の $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V 及びドメイン V と同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第 10 項記載の測定法または請求の範囲第 11 項記載のキット。

2/17

FIG. 2

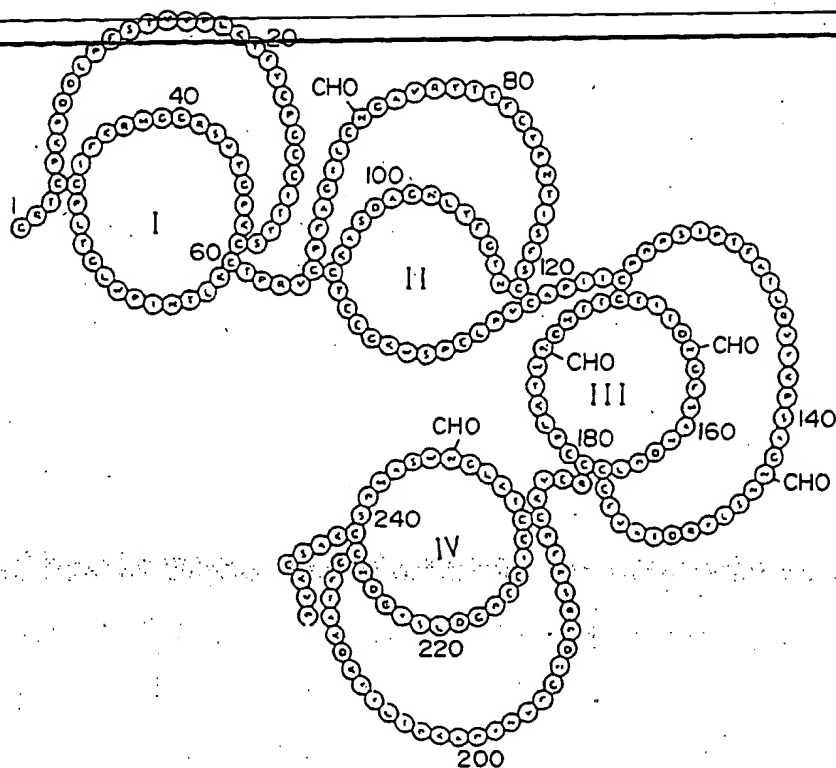
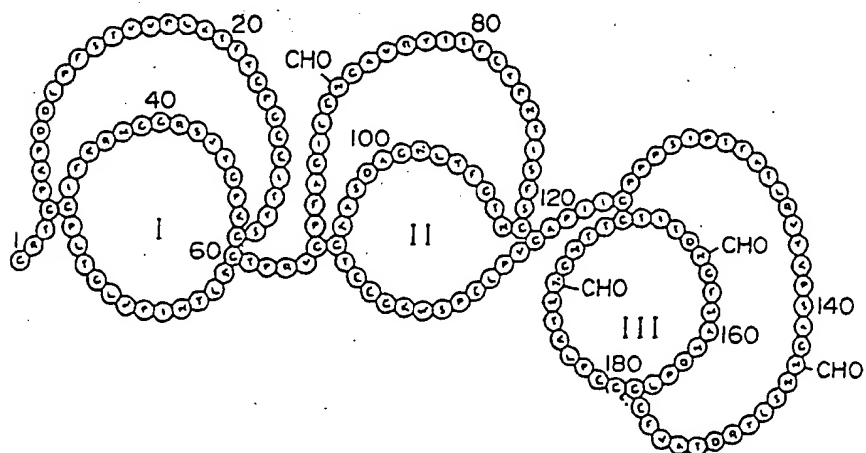


FIG. 3



3/17

FIG. 4

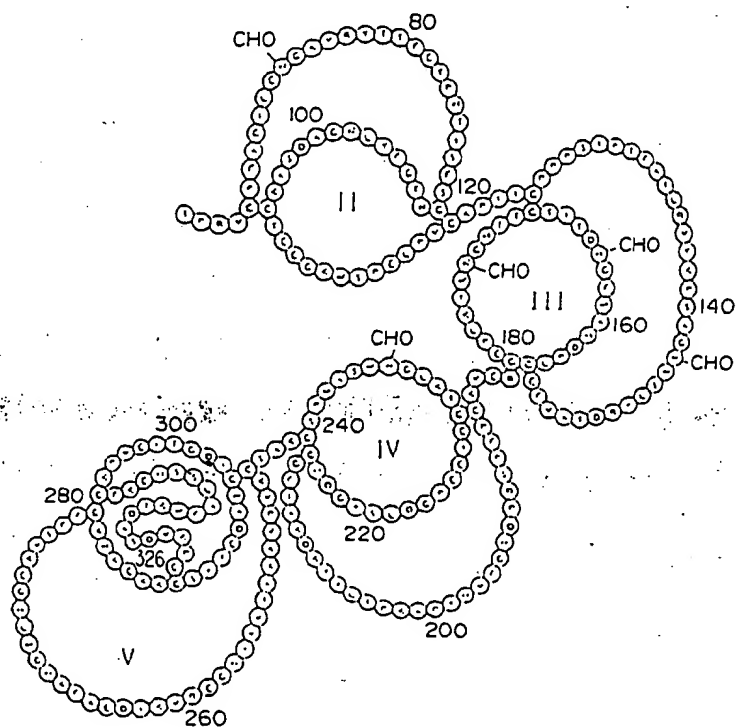
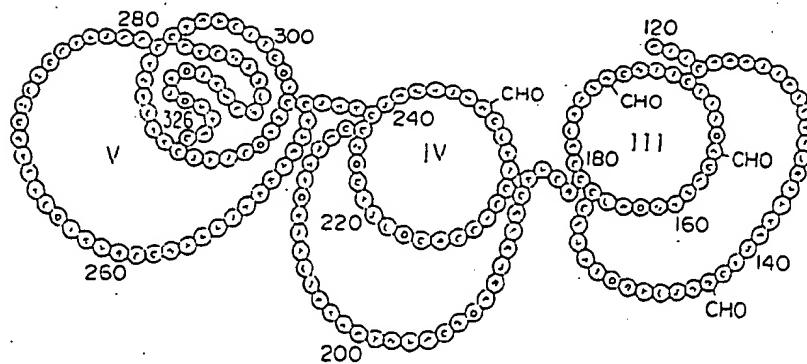
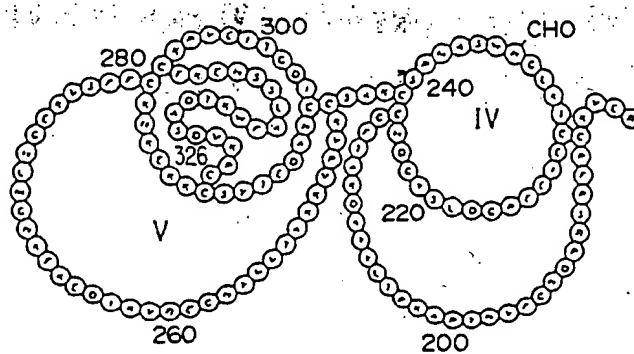


FIG. 5



4/17

FIG. 6



5/17

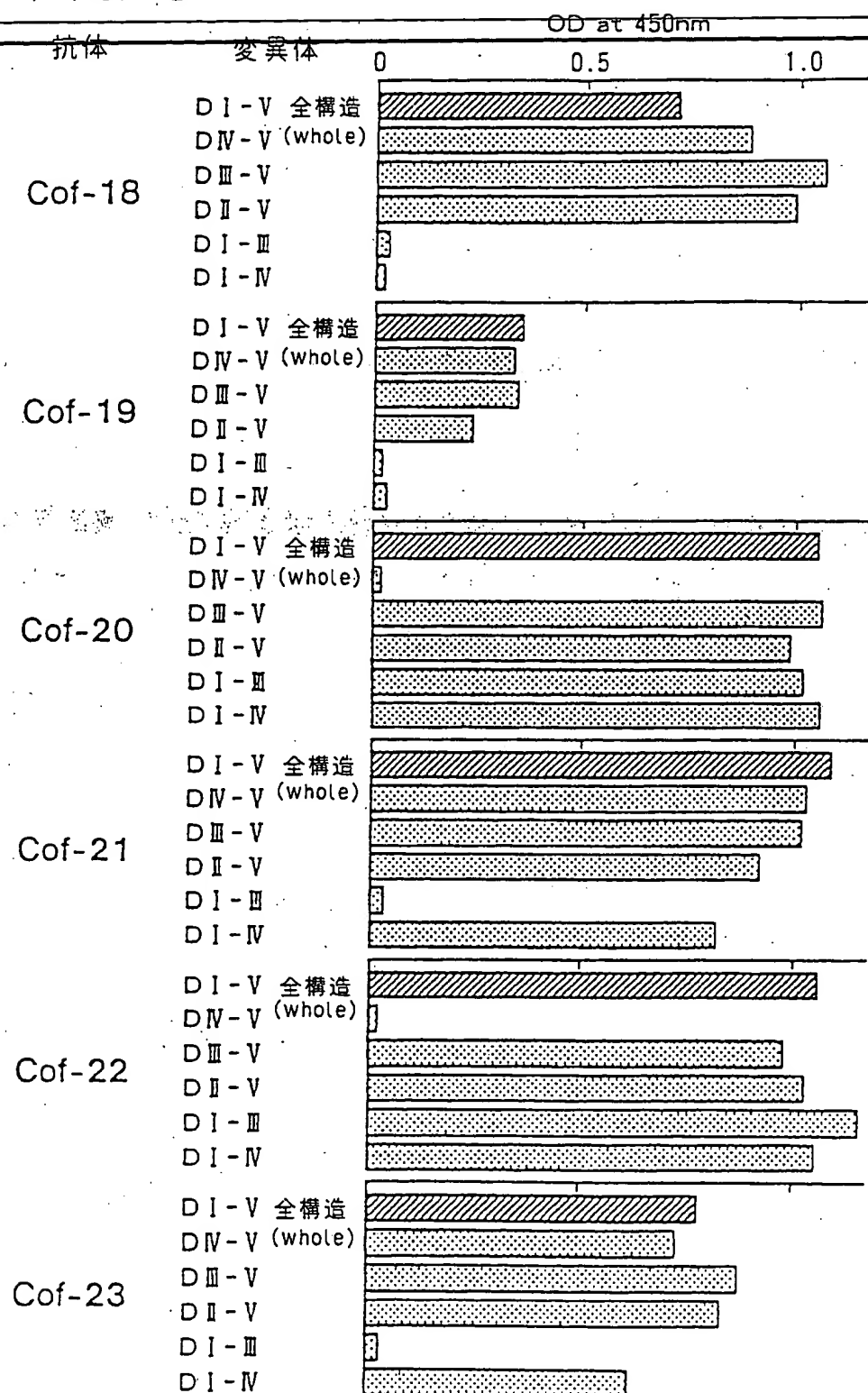
FIG. 7



- レーン 1 ; 血清由来 β_2 -GPI
2 ; リコンビナント β_2 -GPI
(D I - V , 全構造 (whole))
3 ; D IV - V
4 ; D III - V
5 ; D II - V
6 ; D I - III
7 ; D I - IV

6/17

FIG. 8



差替え用紙 (規則26)

7/17

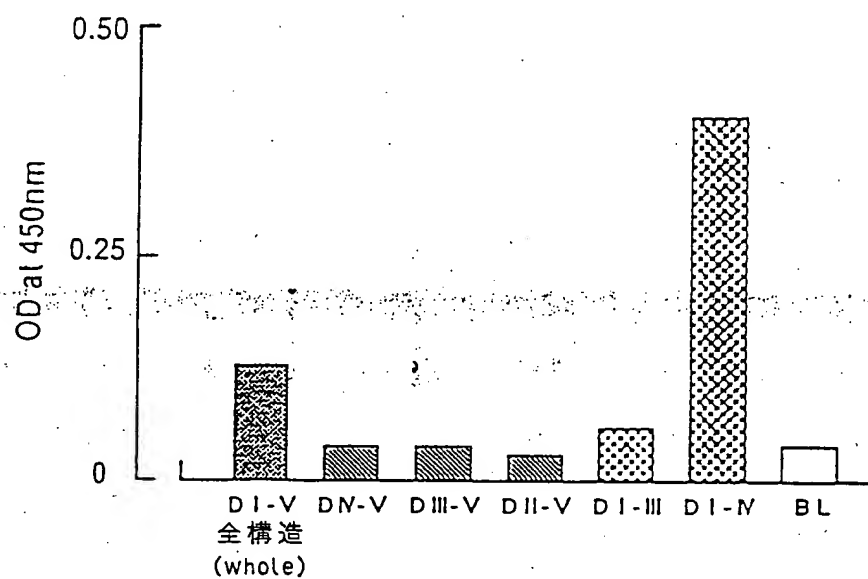
FIG. 9

| | 欠失変異蛋白 | | | | | | エピソード |
|--------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | DIV-V | DIII-V | DII-V | DI-III | DI-IV | DI-IV | |
| Cof-18 | + | + | + | + | + | + | V |
| Cof-19 | + | + | + | + | + | + | V |
| Cof-20 | + | + | + | + | + | + | ≡ |
| Cof-21 | + | + | + | + | + | + | N |
| Cof-22 | + | + | + | + | + | + | ≡ |
| Cof-23 | + | + | + | + | + | + | N |

8/17

FIG. 10

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

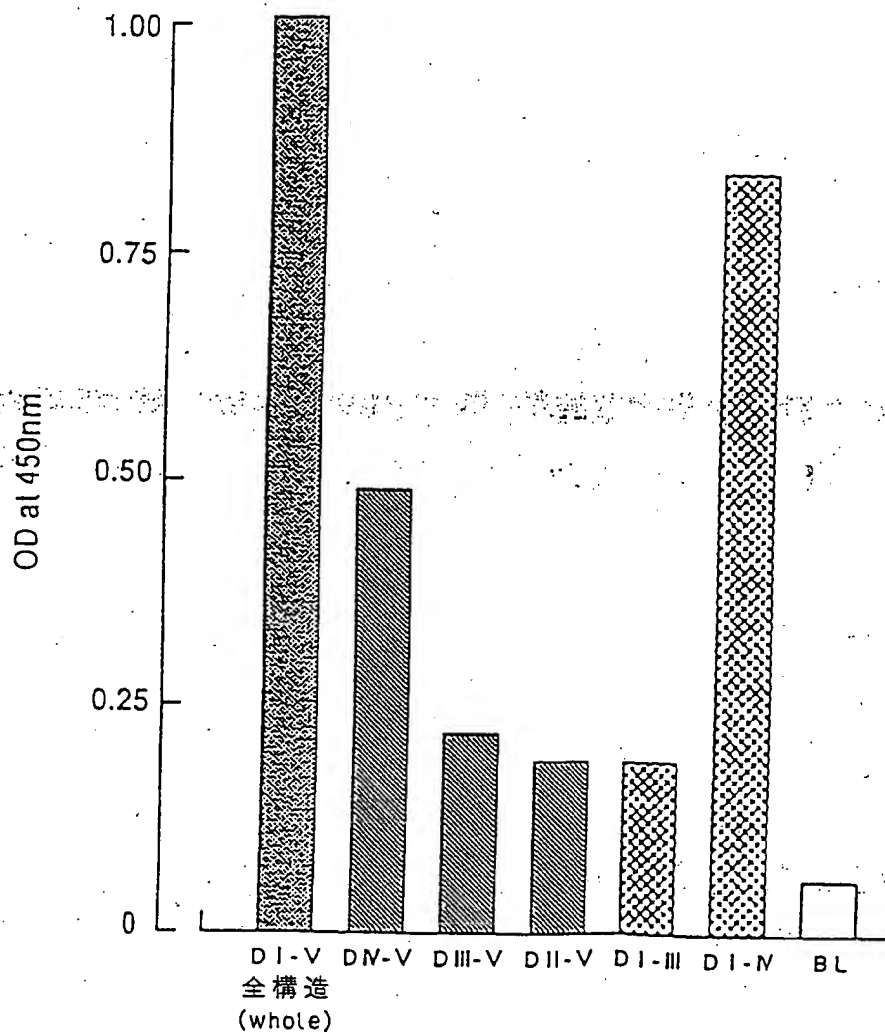


欠失変異蛋白

9/17

FIG. II

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)



欠失変異蛋白

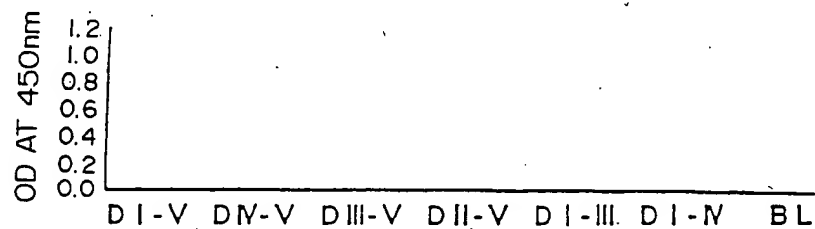
10/17

FIG. 12

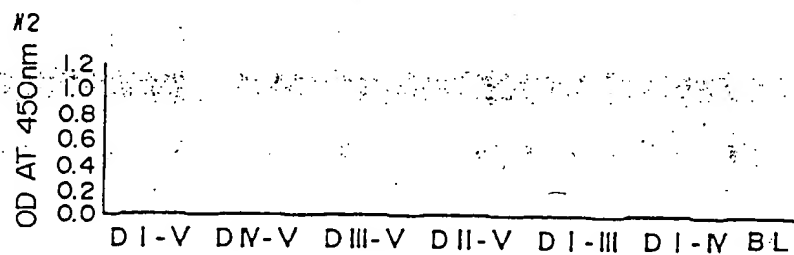
酸素原子非導入のプレート

(Non-oxygenated plate)

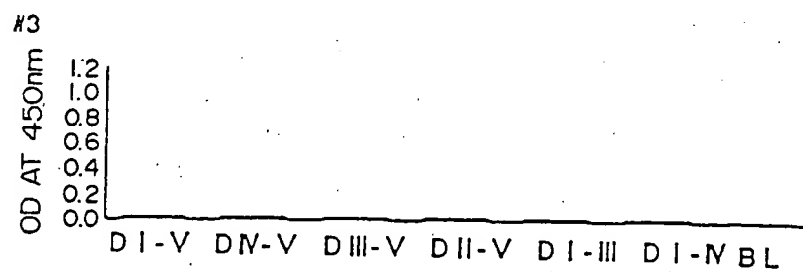
健康人 #1



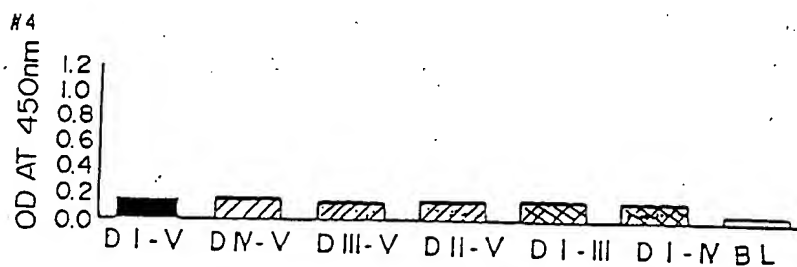
欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



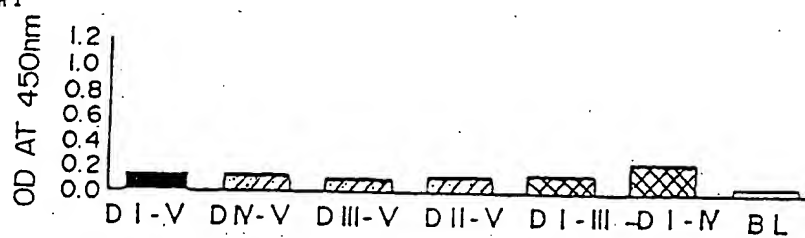
欠失変異蛋白

11/17

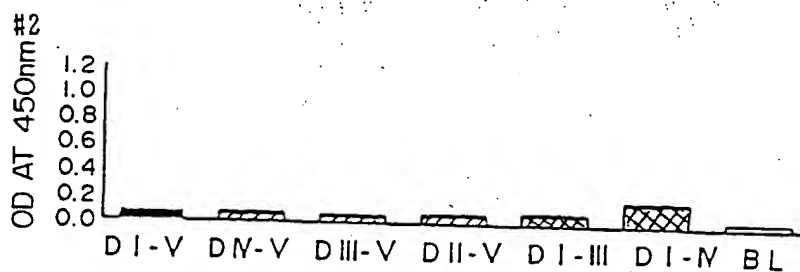
FIG. 13

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

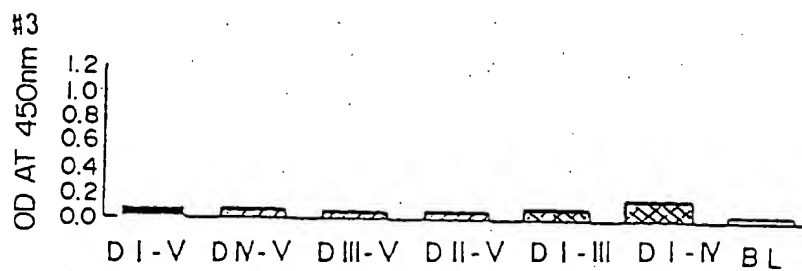
SLE #1



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



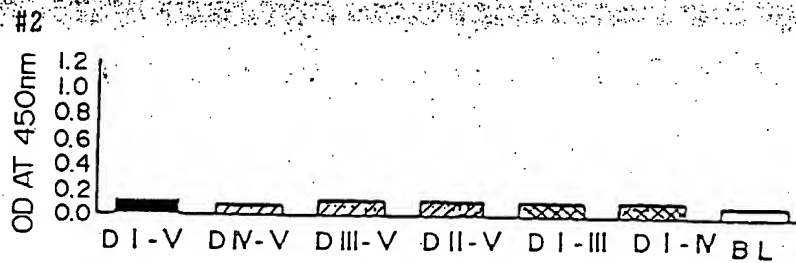
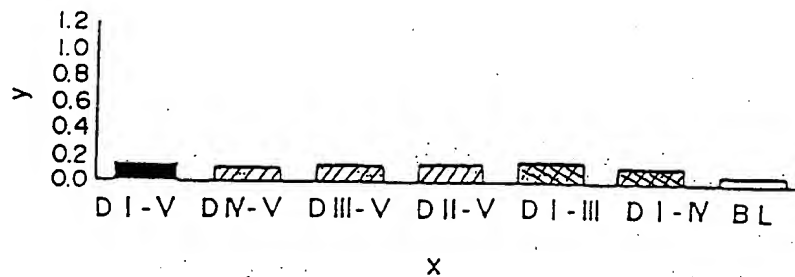
欠失変異蛋白

12/17

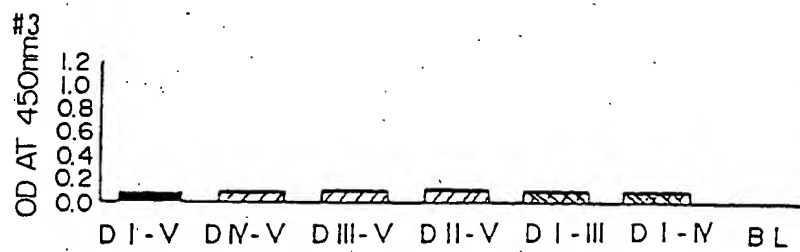
FIG. 14

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

梅毒患者#1



欠失変異蛋白



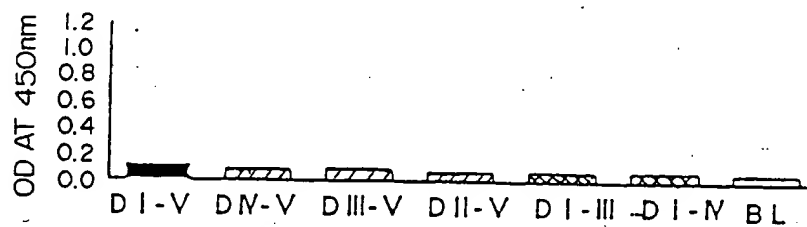
欠失変異蛋白

13/17

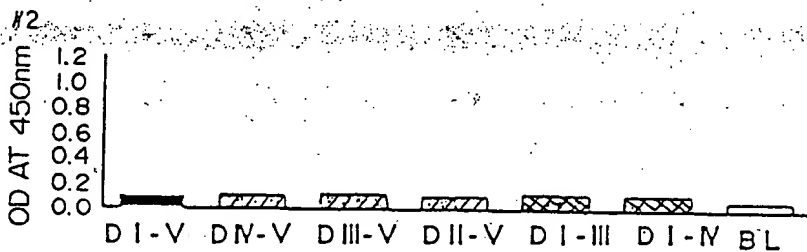
FIG. 15

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

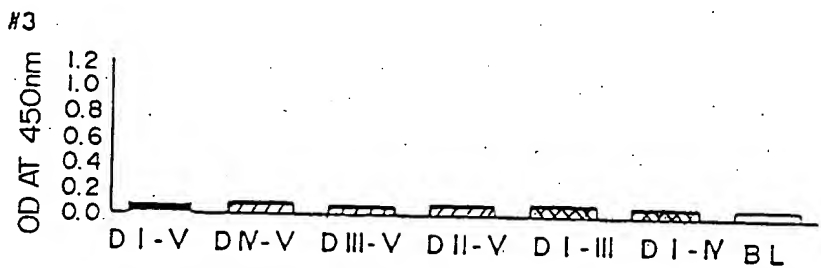
健康人 #1



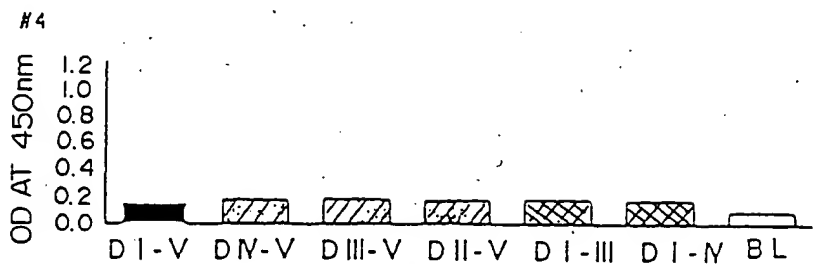
欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



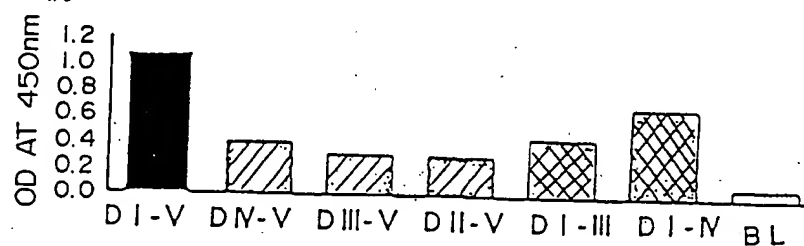
欠失変異蛋白

14 / 17

FIG. 16

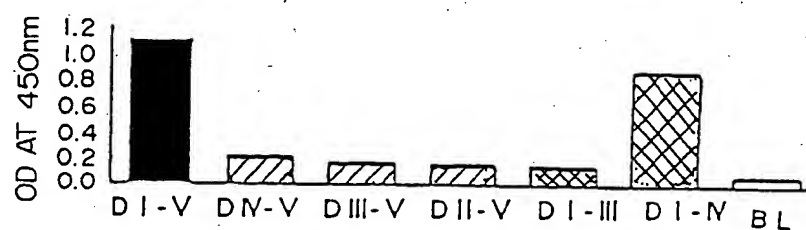
酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

SLE #1



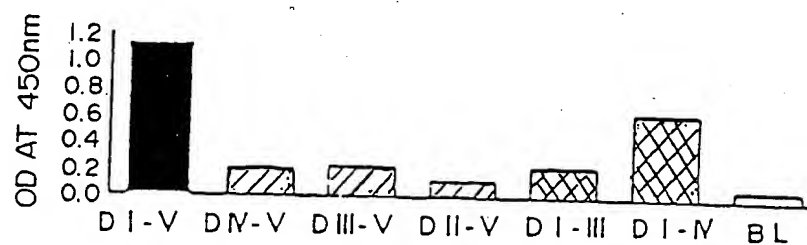
欠失変異蛋白

#2



欠失変異蛋白

#3



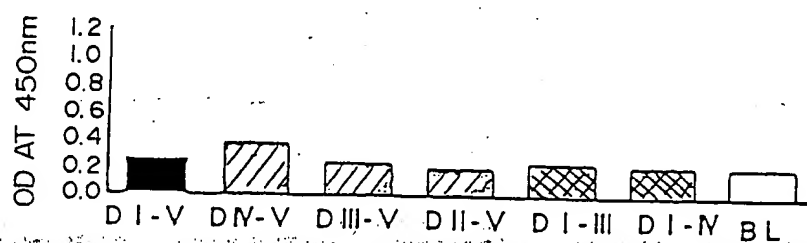
欠失変異蛋白

15/17

FIG. 17

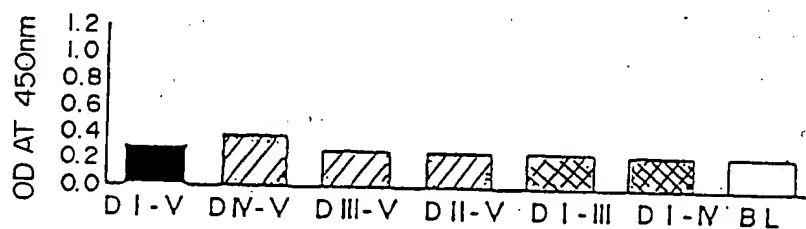
酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

梅毒患者 #1



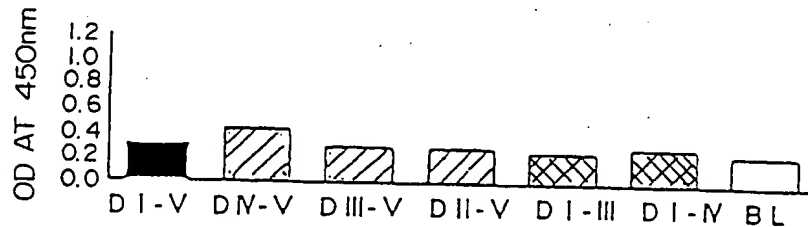
欠失変異蛋白

#2



欠失変異蛋白

#3



欠失変異蛋白

16/17

FIG. 18

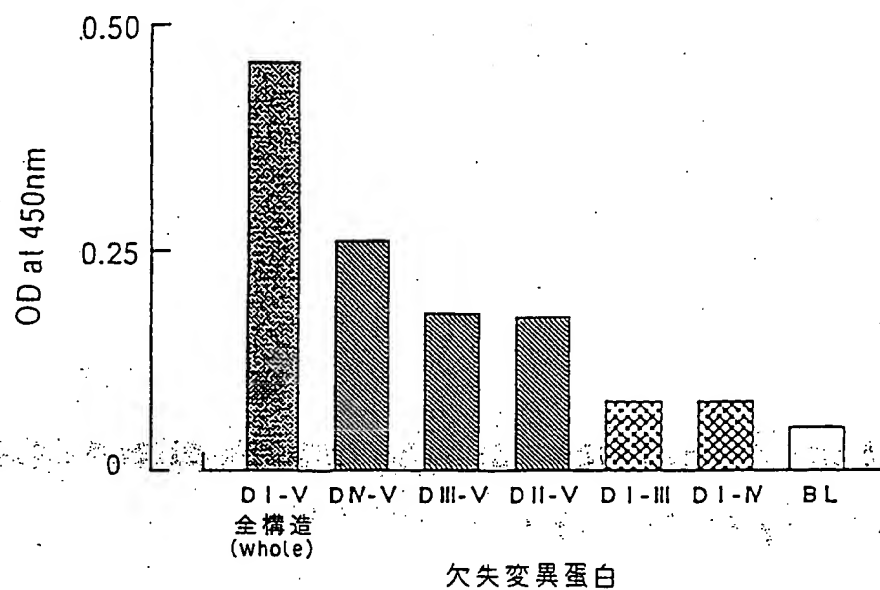
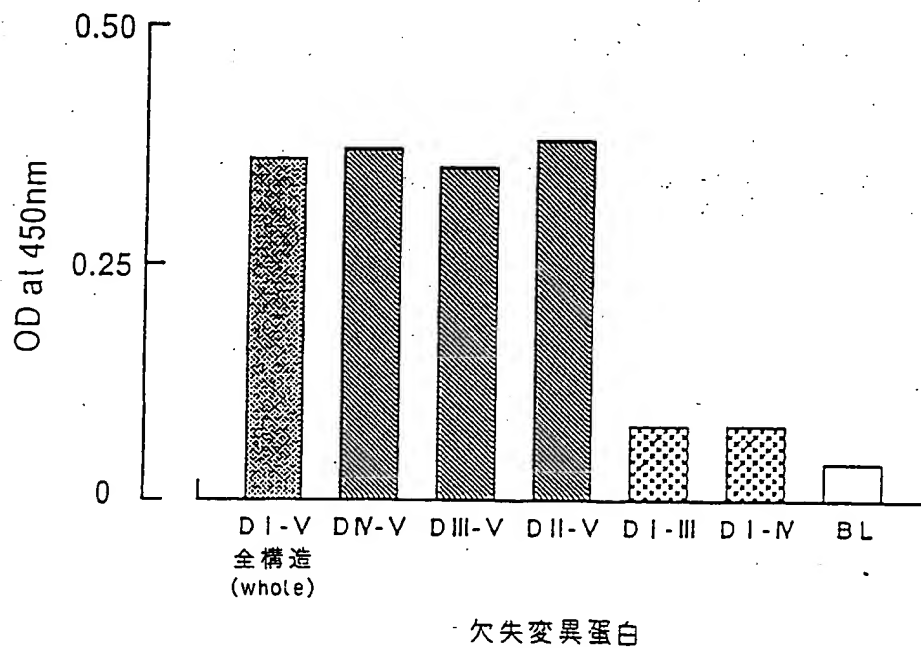
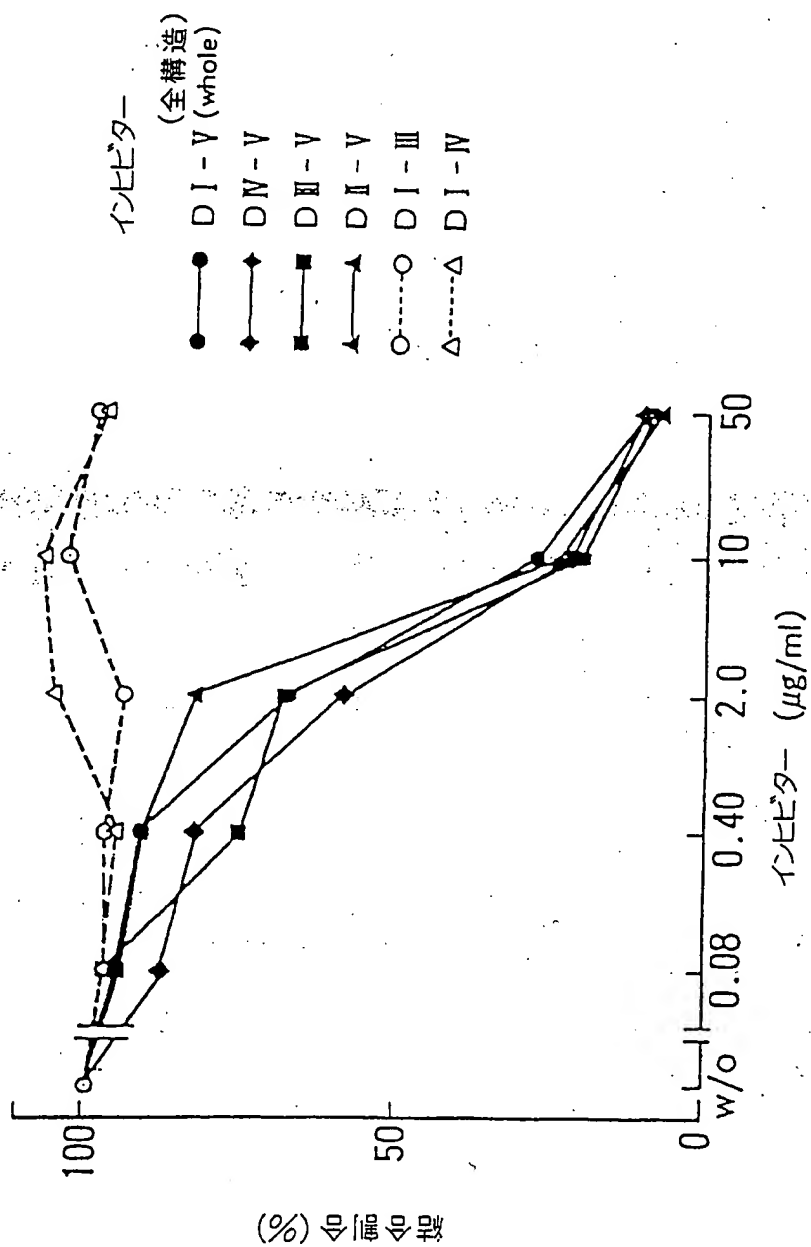


FIG. 19



17/17

FIG. 20



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/01929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ G01N33/564, 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ G01N33/564, 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO, A1, 93/16387 (Yamasa Corp.), August 19, 1993 (19. 08. 93), | 1-12 |
| A | WO, A1, 91/06006 (Yamasa Corp.), May 2, 1991 (02. 05. 91), &EP, A, 450099 | 1-12 |
| A | JP, A, 4-506415 (Yamasa Corp.) November 5, 1992 (05. 11. 92), &WO, A, 91/15772 | 1-12 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 30, 1995 (30. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 21, 1995 (21. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ G 01 N 33 / 564 . 33 / 53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ G 01 N 33 / 564 . 33 / 53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1994年

日本国公開実用新案公報 1971-1994年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | WO, A1, 93 / 16387 (ヤマサ醤油株式会社), 19. 8月. 1993 (19. 08. 93) | 1-12 |
| A | WO, A1, 91 / 06006 (ヤマサ醤油株式会社), 2. 5月. 1991 (02. 05. 91) & EP, A, 450099 | 1-12 |
| A | JP, A, 4-506415 (ヤマサ醤油株式会社), 5. 11月. 1992 (05. 11. 92) & WO, A, 91 / 15772 | 1-12 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 01. 95

国際調査報告の発送日

21. 02. 95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2 J 9 0 1 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3252